

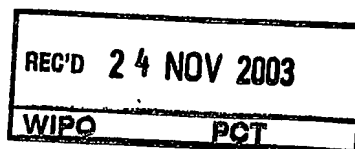
REC'D PCT/PTO 28 FEB 2005

PCT/EP 03/09694

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**



Aktenzeichen: 102 40 098.9

Anmeldetag: 30. August 2002

Anmelder/Inhaber: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, München/DE;
Professor Dr. Rainer Rudolph,
Halle, Saale/DE.

Erstanmelder: Garching Innovation GmbH,
München/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Synthese und selektiven bio-
katalytischen Modifizierung von Peptiden,
Peptidmimetika und Proteinen

IPC: C 12 P 21/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 25. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

R. G. G.
Bresig

Verfahren zur Synthese und selektiven biokatalytischen Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und Proteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Synthese und/oder selektiven Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und/oder Proteinen unter Verwendung ionischer Flüssigkeiten sowie die Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als ausschließliches Reaktionsmedium oder in Kombination mit Wasser und/oder organischen Lösungsmitteln zur Unterdrückung hydrolytischer und proteolytischer Nebenreaktionen.

Die Synthese und selektive Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und Proteinen besitzt zunehmende Bedeutung für das systematische Studium von Struktur-Funktionsbeziehungen der Polypeptide als funktionelle Genprodukte und trägt entscheidend zur Entdeckung neuer wirksamer Therapeutika bei (vgl. H.-D. Jakubke, *Peptide: Chemie und Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996). Wesentliche Probleme ihrer Synthese oder selektiven Modifizierung sind jedoch die fehlende Selektivität und Universalität chemischer Verfahren und die Substratlimitation bzw. das Auftreten zahlreicher Nebenreaktionen bei der Verwendung von Enzymen als Katalysatoren.

Grundsätzlich lassen sich für die Synthese von Peptiden, Peptidmimetika und Proteinen die in der Peptidchemie entwickelten chemischen Methoden einsetzen. Diese unterliegen jedoch erheblichen Limitationen mit steigender Komplexität der Produkte. Während Peptide mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 50-60 Aminosäuren direkt durch Festphasenpeptidsynthese zugänglich sind, führt eine weitere Kettenverlängerung wegen der nicht in jedem Fall quantitativen Kupplungsausbeuten häufig zur Akkumulation einer Vielzahl von Nebenprodukten, die sowohl zu einer Verringerung der Syntheseausbeuten führen wie auch die Reinigung des gewünschten Produktes erschweren bzw. verhindern. Gegenwärtige Methoden zur Synthese längerer Polypeptide bzw. von Proteinen beruhen daher auf der Kondensation von synthetisch bereitgestellten Peptidfragmenten, wobei jedoch die Verknüpfung vollgeschützter Peptidfragmente wegen der häufig sehr geringen Löslichkeit der Edukte nur in Ausnahmefällen möglich ist.

Die basierend auf dem erstmals 1953 vorgeschlagenen Konzept der Molekülklammer für chemische CN-Ligationen von ungeschützten Peptidfragmenten (T. Wieland et al., *Annalen* 1953, 583, 129; M. Brenner et al., *Helv. Chim. Acta* 1957, 40, 1497) entwickelten Methoden des Amin- und Thioleinfangs (D.S. Kemp et al., *J. Org. Chem.* 1975, 40, 3465; N. Fotouhi et al., *J. Org. Chem.* 1989, 54, 2803), der natürlichen chemischen Ligation (M. Schnölzer, S.B.H. Kent, *Science* 1992, 256, 221; P.E. Dawson et al., *Science* 1994, 266, 776) oder auch der Aldehyd-Methode (C.-F. Liu, J.P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 6584) verlaufen zwar selektiv, erfordern aber für deren Realisierung ganz bestimmte N- bzw. C-terminale Aminosäurereste, so dass ihre Anwendbarkeit sequenzspezifischen Voraussetzungen unterliegt. Bei der z.Z. favorisierten nativen chemischen Ligation erfolgt die Verknüpfung eines synthetischen Peptids mit einer C-terminalen Thioestergruppierung mit einem zweiten Peptid oder Protein, das einen N-terminalen Cysteinrest enthalten muß. Unter Nutzung der Erkenntnisse des Proteinspleißens wurde die native chemische Ligation zu einer Intein-vermittelten Protein-Ligation (*expressed protein ligation*, EPL; vgl. u. a. T.W. Muir et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 6705; G.J. Cotton et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 1100), bei der die Thioestergruppierung der Carboxykomponente aus einem rekombinanten Protein, das mit einem spaltungskompetenten Intein fusioniert ist und durch thiolytische Spaltung gebildet wird, weiterentwickelt. Neben der Notwendigkeit eines Cysteinrestes am N-Terminus der Aminokomponente liegt ein weiterer genereller Nachteil in der nicht auszuschließenden partiellen Epimerisierung des C-terminalen Aminosäurerestes, da der sich bildende Thioester (zumindest bei Einsatz von Thiophenol als Katalysator) nicht nur erst nach der Umesterung, sondern auch direkt von der terminalen α -Aminogruppe der zugesetzten Aminokomponente nukleophil angegriffen werden kann.

Katalytische Syntheseverfahren bieten den Vorteil einer höheren Flexibilität hinsichtlich der zu synthetisierenden Peptidbindung, obgleich aus der Natur zumindest bislang keine universelle Peptidligase mit präparativer Relevanz bekannt ist. So zeigen katalytische Antikörper (vgl. u. a. P.G. Schultz, R.A. Lerner, *Science* 1995, 269, 1835; G. MacBeath, D. Hilvert, *Chem. Biol.* 1996, 3, 433; D.B. Smith et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 278) CN-Ligaseaktivität, ebenso wie synthetische Peptidligasen basierend auf einem *coiled-coil*-Motif von GCN4 (K. Severin et al., *Nature* 1997, 389, 706) bzw. auf einer Peptidmatrize bestehend aus einem stark sauren *coiled-coil*-Peptid (S. Yao, J. Chmielewski, *Biopolymers* 1999, 51, 370). Bei allen diesen Fällen handelt es sich zweifelsohne um interessante Ansatzpunkte für das Design von Peptidligasen, die für Ligationen allerdings spezielle Voraussetzungen erfordern und deren allgemeine Anwendbarkeit folglich sehr stark limitiert ist. Die Nutzung des reversen Katalysepotentials von Peptidasen (vgl. u. a. W. Kullmann, *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC Press, Boca Raton, 1987;

H.-D. Jakubke, *Enzymatic Peptide Synthesis*, in: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 9, (Eds.: S. Udenfriend, J. Meienhofer), Academic Press, New York, 1987, Chapter 3) bietet zwar die prinzipielle Möglichkeit, Peptidsegmente unter speziellen Voraussetzungen enzymatisch zu verknüpfen, doch ist weder die Irreversibilität der geknüpften speziellen Peptidbindung garantiert noch sind unerwünschte proteolytische Spaltungen in den zu verknüpfenden Segmenten bzw. im Endprodukt a priori auszuschließen, wenn sich dort potentielle Spaltstellen für die eingesetzte Peptidase befinden. Obgleich durch Reengineering verschiedener Peptidasen, wie z.B. Subtilisin das Katalysepotential zur Peptidbindungsknüpfung verbessert und auch durch anspruchsvolle Fragmentkondensationen (vgl. u.a. D.Y. Jackson et al., *Science* 1994, 266, 243) belegt werden konnte, können dadurch die oben geschilderten Nachteile nicht ausgeräumt werden. Das für CN-Ligationen von Peptid- und Proteinsegmenten entwickelte Substratmimetika-Konzept (F. Bordusa et al., *Angew. Chem.* 1997, 109, 2583; Review: F. Bordusa, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2000, 72, 469) hat zwar den Vorteil der Irreversibilität, bedarf aber ebenfalls der Verwendung synthetischer, proteolytisch inaktiver Proteasevarianten, um kompetitive Spaltungen innerhalb der zur verknüpfenden Biopolymere zu verhindern.

Zur Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und Proteinen spielten – und spielen noch immer – chemische Verfahren (vgl. T. Imoto, H. Yamada, *Chemical Modification*, in *Protein Function. A Practical Approach* (T.E. Creighton, ed.) pp. 247-277, IRL Press, 1989; G.E. Means, R.E. Feeney, *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, 1971) eine bedeutende Rolle in der Proteinforschung. So ist trotz des schnellen Fortschritts der NMR-Technik, die im letzten Jahrzehnt eine vollständige Signalzuordnung und somit eine Aufklärung der 3D-Strukturen von Proteinen bis zu 150 – 200 Aminosäurebausteinen (ohne Modifizierung) ermöglichte, die chemische Modifizierung weiterhin auch ein Werkzeug zur Raumstrukturbestimmung in Lösung, da große Proteine der NMR-Strukturanalyse nicht zugänglich sind und die Röntgenstrukturanalyse Proteinkristalle erfordert, die in sehr vielen Fällen nicht erhalten werden können.

Da N-terminale α -Aminogruppen bevorzugte Ziele von selektiven Modifizierungen sind, erlauben die ϵ -Aminogruppen ubiquitär in Proteinen und Peptiden vorkommender Lysinreste keine gezielte Einführung von Marker- und Reportergruppen an den N-Terminus. Chemische Acylierungsreaktionen werden mit Anhydriden oder vorrangig mit aktiven Estern, wie z.B. *N*-Hydroxysuccinimid- oder 4-Nitrophenylestern durchgeführt, womit aber auch andere Seitenkettenfunktionen proteinogener Aminosäurereste reagieren können und damit eine selektive *N*^α-Modifikation ausschließen. Lediglich der Phenylacetyl-Rest wurde spezifitätsdeterminiert durch

die Penicillin-Acylase in Umkehrung der nativen Wirkung als Schutzgruppe für Aminosäuren im Rahmen von Peptidsynthesen enzymatisch eingeführt (R. Didziapetris et al., *FEBS Lett.* 1991, 287, 31) und durch das gleiche Enzym wieder abgespalten (vgl. Review: A. Reidel, H. Waldmann, *J. prakt. Chem.* 1993, 335, 109). Abgesehen von dieser direkten Schutzgruppeneinführung wurden nur solche Methoden beschrieben, die auf einer Übertragung bereits N-terminal markierter Aminosäure- oder Peptidderivate mit Peptidase-spezifischen Aminosäureresten in der P₁-Position unter der Katalyse von Peptidasen beruhen und zwangsläufig keine Irreversibilität aufweisen. Eine Ausnahme hiervon ist das ursprünglich für CN-Ligationen von Peptid- und Proteinsegmenten entwickelte Substratmimetika-Konzept (F. Bordusa et al., *Angew. Chem.* 1997, 109, 2583; Review: F. Bordusa, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2000, 72, 469). Diese Methodik hat zwar den Vorteil der direkten und selektiven Einführung von Marker- und Reportergruppen, bedarf aber, wie bereits erwähnt, der Verwendung synthetischer, proteolytisch inaktiver Proteasevarianten als Biokatalysatoren, um kompetitive Spaltungen der zu markierenden Biopolymere zu verhindern.

Die Unterdrückung hydrolytischer und proteolytischer Nebenreaktionen von zur Synthese und Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und Proteinen eingesetzten Hydrolasen kann neben einem gezielten Enzymengineering auch durch Manipulationen am Reaktionsmedium erfolgen. In der Literatur beschrieben ist die Verwendung von einphasigen Mischungen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln, aus analogen biphasischen Systemen im Falle einer Nichtmischbarkeit von Wasser und organischem Lösungsmittel, von reinen organischen Lösungsmitteln mit praktisch keinem oder nur sehr geringem Wasseranteil, von gefrorenen oder unterkühlten wässrigen oder organischen Systemen, von superkritischen Lösungen und von heterogenen eutektischen Mischungen mit praktisch keinem oder nur sehr geringem Lösungsmittelanteil (vgl. u.a. W. Kullmann, *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC Press, Boca Raton, 1987; H.-D. Jakubke, *Enzymatic Peptide Synthesis*, in: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 9, (Eds.: S. Udenfriend, J. Meienhofer), Academic Press, New York, 1987, Chapter 3). Allerdings bewirken praktisch alle diese Methoden eine oft dramatische Verringerung der Enzymaktivität- bzw. Stabilität und bedürfen teilweise eines erheblichen apparativen Aufwandes. Hinzu kommt, dass nur wenige überhaupt hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für die Synthese und Modifizierung länger-kettiger Biopolymere untersucht worden sind. Aber auch in solchen Fällen konnte keines dieser Verfahren bislang die für eine routinemässige Anwendung geforderte Effizienz und Universalität nachweisen.

Eine neue Klasse von Lösungsmitteln repräsentieren Salze, die einen niedrigen Schmelzpunkt aufweisen. Für diese, auch als ionische Flüssigkeiten bezeichneten Lösungsmittelsysteme, konnte in initialen Studien ein stabilisierender Einfluß auf Proteine und Enzyme nachgewiesen werden (Review: C.M. Gordon, *Appl. Catal. A: Gen.* **2001**, 222, 101). An einfachen Modellreaktionen mit Lipasen und Galactosidasen wurde zudem gezeigt, dass diese Flüssigkeiten einen positiven Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit und teilweise auch auf die Selektivität der enzymatischen Reaktionen besitzen (U. Kragl et al., *Chimica Oggi* **2001**, 19, 22; T.L. Husum et al., *Biocatal. Biotrans.* **2001**, 19, 331; S.H. Schofer et al., *Chem. Commun.* **2001**, 425). Am Beispiel eines einfachen Aminosäureester-Substrates konnte weiterhin demonstriert werden, dass auch die Serinproteasen Chymotrypsin und Subtilisin in Reaktionssystemen mit hohem Anteil an solchen Flüssigkeiten enzymatisch aktiv ist und sowohl die Hydrolyse des Esters wie auch dessen Transesterifizierung katalysiert (J.A. Laszlo, D.L. Compton, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 75, 181; T.L. Husum et al., *Biocatal. Biotrans.* **2001**, 19, 331). Anhand der Synthese von Z-Asp-Phe-OMe aus Z-Asp-OH und H-Phe-OMe durch die Metalloprotease Thermolysin konnte zudem die prinzipielle Eignung von ionischen Flüssigkeiten für die Protease-katalysierte Verknüpfung zweier Aminosäuren unter gleichgewichtskontrollierten Synthesebedingungen demonstriert werden (M. Erbdinger et al., *Biotechnol. Prog.* **2000**, 16, 1131). Bislang völlig unbekannt hingegen ist, ob in solchen Flüssigkeiten Peptidfragmente selektiv durch Proteasen in einer kinetisch-kontrollierten Reaktionsführung verknüpft werden können und ob unter diesen Bedingungen eine selektive Einführung von Reporter- und Markergruppierungen an den N-Terminus von Peptiden und Proteinen durch Proteasen katalysiert wird. In gleicher Weise ist unklar, welchen Einfluß ionische Flüssigkeiten auf das Ausmaß proteolytischer Nebenreaktionen an den Edukten sowie hydrolytischer Nebenreaktionen am eingesetzten Estersubstrat besitzen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur enzymatischen Synthese und Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und Proteinen bereitzustellen, welches die Nachteile der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren überwindet. Weiterhin ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, bei dem eine sequenzunabhängige Synthese, insbesondere Ligation und N-terminale Modifizierung, ohne proteolytische und hydrolytische Nebenreaktionen an den Edukten bzw. den Reaktionsprodukten regio- und stereoselektiv erfolgt.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Synthese von Peptiden, Peptidmimetika und/oder Proteinen und/oder zur selektiven N-terminalen Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und/oder Proteinen gelöst,

mit den Schritten:

- a) Bereitstellen einer Aminokomponente, wobei die Aminokomponente mindestens eine Aminosäure aufweist,
- b) Bereitstellen einer Carboxykomponente, wobei die Carboxykomponente eine Abgangsgruppe an der Carboxylgruppe aufweist, und die Carboxykomponente eine Verbindung mit mindestens einer Aminosäure ist oder eine Verbindung mit mindestens einer Marker- oder Reportergruppe,
- c) Umsetzen der Aminokomponente und der Carboxykomponente in einem Reaktionsmedium, welches ein oder mehrere ionische Flüssigkeiten aufweist, in Gegenwart einer Protease, Peptidase und/oder Hydrolase, wobei zwischen der Aminokomponente und der Carboxykomponente unter Abspaltung der Abgangsgruppe eine Peptidbindung gebildet wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass das erfindungsgemäße Verfahren weiter den Schritt umfasst:

- d) Isolieren oder Anreichern des erhaltenen Peptids, Peptidmimetikums und/oder Proteins nach an sich bekannten Verfahren.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als ausschließliches Lösungsmittel oder in Kombination mit Wasser und/oder organischen Lösungsmitteln zur Synthese und/oder N-terminalen Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und/oder Proteinen. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung einer Protease, Peptidase und/oder Hydrolase zur Synthese und/oder N-terminalen Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und Proteinen, wobei das Peptid, Peptidmimetikum und Protein oder deren N-terminal markierte Spezies durch Ligation einer Aminokomponente und einer Carboxykomponente hergestellt wird und die Carboxykomponente eine Abgangsgruppe aufweist.

Weitere Ausführungsformen ergeben sich aus den Unteransprüchen und der nachfolgenden Beschreibung.

Erfindungsgemäß sind unter Peptiden Kondensationsprodukte von Aminosäuren mit etwa 2-10 Aminosäuren zu verstehen. Unter Polypeptiden sind erfindungsgemäß Kondensationsprodukte von Aminosäuren mit etwa 10 – 100 Aminosäuren zu verstehen und der Begriff Proteine wird

erfindungsgemäß für Kondensationsprodukte von Aminosäuren verwendet, die mehr als etwa 100 Aminosäuren aufweisen, wobei der Übergang zwischen den beiden Begriffen in der Literatur als fließend angesehen wird.

Mit Peptidmimetika sind erfindungsgemäß Verbindungen bezeichnet, die die biologische Aktivität eines Peptides nachahmen oder antagonisieren ohne selbst einen klassischen Peptidaufbau ausschließlich aus kodierten Aminosäuren zu besitzen. Beispiele für Peptidmimetika sind neben gänzlich nichtpeptidischen organischen Verbindungen (z.B. das aus cyclo-aliphatischen und aromatischen Strukturen aufgebaute Morphin bzw. Naloxon) auch solche, die modifizierte Aminosäuren (z.B. N-, α - und β -alkylierte Aminosäuren; C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ und N-C $_{\beta}$ cyclisierte Aminosäuren; Peptide mit modifizierten Seitenketten wie z.B. α -, β -dehydrogenierte Aminosäuren, Nitrotyrosin etc.) aufweisen, sowie cyclische Peptidanaloga (Cyclisierung von N-Terminus mit C-Terminus bzw. Aminosäureseitenkette; Cyclisierung von C-Terminus mit Aminosäureseitenkette bzw. Cyclisierung von Aminosäureseitenketten mit Aminosäureseitenkette) und Peptide mit modifizierten Peptidbindungen wie z.B. Thioamiden, Ketomethylenen, Ethylenen, Methylenaminen oder auch Retro-Inverso-Derivaten u.ä. Retro-Inverso-Derivate sind Verbindungen mit der Peptidrückgrat-Struktur $R-C-NH-CO-C-R'$, bei denen die Stellung der Aminofunktion und der Carbonsäurefunktion im Vergleich zu normalen Peptidbindungen vertauscht ist, während normale Peptidbindungen die Struktur $R-C-CO-NH-C-R'$ aufweisen.

Ionische Flüssigkeiten sind, im Gegensatz zu Salzschnmelzen, bei niedrigen Temperaturen (<100°C) schmelzende Salze, die ausschließlich aus Ionen bestehen (Lit. S. z.B. T. Welton, Chem. Rev. 1999, 2071-2083). Nach dieser Definition ist Wasser also keine ionische Flüssigkeit. Charakteristische Merkmale sind ihre niedrige Symmetrie, geringe intermolekulare Wechselwirkungen und eine gute Ladungsverteilung. Typische Kationen enthalten quaternisierte Heteroatome wie etwa quaternisierte Ammonium- oder quaternisierte Phosphonium-Ionen. Untergruppen sind z.B. N-alkylierte Imidazolium-Ionen wie 1-Ethyl-3-methylimidazolium, 1-Butyl-3-methylimidazolium; N-alkylierte Pyridiniumionen wie 4-Methyl-N-butyl-pyridinium bzw. analog substituierte Ammonium- und Phosphoniumionen. Typische Anionen können sowohl anorganischer als organischer Natur sein wie z.B. Chlorid, Bromid, Cloraluminat, Nitrat, Benzosulfonat, Triflat, Tosylat oder auch Tetrafluorborat.

Ausgehend von dem bisher im Stand der Technik beobachteten Phänomen, dass der vollständige aber auch teilweise Ersatz von Wasser als Reaktionsmedium durch reaktionsinerte Lösungsmittel zu einem Aktivitätsverlust bis hin zur Inaktivierung des Enzyms führt, lag der vorliegenden

Erfindung die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass es möglich ist, eine mit einer Abgangsgruppe versehene Carboxykomponente, wobei die Carboxykomponente ein Peptid, Peptidmimetika, Protein bzw. eine Marker- oder Reportergruppierung darstellt, mit hoher Syntheserate und Selektivität enzymkatalysiert, unter Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als abschließendes Lösungsmittel oder in Kombination mit Wasser und/oder organischen Lösungsmitteln als Reaktionsmedium, mit einer Aminokomponente, die vorzugsweise ein Peptid, Peptidmimetika und Protein darstellt, zu verknüpfen.

Dabei war weiterhin überraschend, dass die typischerweise ablaufenden Nebenreaktionen wie die Hydrolyse der Bindung zwischen Carboxykomponente und Abgangsgruppe sowie die Proteolyse von der Spezifität des Enzyms entsprechenden Peptidbindungen in den Edukten bzw. den Produkten der Reaktion praktisch nicht ablaufen. Die Carboxykomponente wird mit der Abgangsgruppe typischerweise dadurch versehen, dass die Abgangsgruppe ester-, thioester- oder amidartig mit der C-terminalen Carboxylfunktion der Carboxykomponente verknüpft wird. Dem erfindungsgemäßen Verfahren liegt somit die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass ionische Flüssigkeiten oder Mischungen daraus im Gegensatz zu praktisch allen anderen organischen Lösungsmitteln einen die Syntheseaktivität des Enzyms begünstigenden Einfluss aufweisen und gleichzeitig die typischerweise durch das Lösungsmittel Wasser vermittelten unerwünschten Nebenreaktionen praktisch vollständig unterdrücken. Durch den kombinierten Einsatz ionischer Lösungsmittel mit Carboxykomponenten, die enzymspezifische Abgangsgruppen enthalten, kann weiterhin eine Unabhängigkeit der Syntheseaktivität von der ursprünglichen Substratspezifität des Enzyms erreicht werden, was die synthetische Anwendungsbreite des Verfahrens entscheidend erhöht.

Es wurde gefunden, dass alle bislang untersuchten Serin- und Cysteinproteasen das vorstehend beschriebene Verhalten zeigen und somit im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahren zur Synthese und Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und Proteinen besonders geeignet sind. Weitere geeignete Enzyme können im Rahmen von Screening-Prozessen unter Verwendung geeigneter Modellreaktionen, wie sie auf der Grundlage der hierin offenbarten technischen Lehre durchgeführt werden können, erhalten werden.

Im Rahmen eines derartigen Screening-Prozesses wird dabei so vorgegangen, dass die Syntheseaktivität von Proteasen, Peptidasen und/oder Hydrolasen in ionischen Flüssigkeiten oder Mischungen daraus mittels synthetischer Modellreaktionen untersucht wird. Hierzu wird im einfachsten Fall eine aus einer Aminosäure bestehende Carboxykomponente (herkömmliche Car-

boxykomponenten oder Substratmimetikum) mit einer Aminokomponente, im einfachsten Fall ein Amid einer Aminosäure, bevorzugter Weise aber einem Peptid, und der zu testenden Protease, Peptidase oder Hydrolase inkubiert. Die Toleranz von ionischen Flüssigkeiten durch das Enzym wird durch Produktbildung im Verlauf der nachfolgenden Inkubationsphase angezeigt. Die Produktbildung selbst kann beispielsweise mittels HPLC oder anderer chromatographischer Trennmethode analysiert werden.

Erfindungsgemäß sind als Proteasen Cysteinproteasen oder Serinproteasen bevorzugt. Es können aber grundsätzlich alle anderen bekannten Arten von Proteasen, also auch Aspartatproteasen oder Metalloproteasen eingesetzt werden. Als weitere Hydrolasegruppen kommen insbesondere Lipasen oder Esterasen in Frage. Als Peptidasen (EC 3.4.11-3.4.19) können erfindungsgemäß ebenfalls die bekannten Peptidaseuntergruppen grundsätzlich eingesetzt werden. Zur Definition von Hydrolasen, Peptidasen und Proteinasen sei insbesondere auf Römpp Chemielexikon, 9. Auflage, 1989 – 1992 verwiesen.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gründet sich auf der Regiospezifität der verwendeten Enzyme und des nichtvorhandenen Racemisierungsrisikos gegenüber den meisten chemischen Verfahren. Dies ist insoweit vorteilhaft, als dass Edukte mit chiralen Zentren und anderen acylierbaren Funktionen ohne experimentell aufwendige und zu zusätzlichen Nebenreaktionen führenden temporären und selektiven Blockierungsmaßnahmen eingesetzt werden können. Ausnahmen sind lediglich die in einigen Fällen notwendige Einführung N-terminaler Schutzgruppen in die Carboxykomponente, die insbesondere dann erforderlich wird, wenn die N-terminale Sequenz der Carboxykomponente eine höhere Spezifität zum Enzym aufweist als die N-terminale Sequenz der Aminokomponente. Darüber hinaus existieren im Gegensatz zu den selektiven chemischen Methoden praktisch keine Beschränkungen hinsichtlich der Sequenz der in Reaktion tretenden Edukte.

Erfindungsgemäß können Proteasen, Peptidasen und/oder Hydrolasen als Enzyme eingesetzt werden. Diese weisen bevorzugt eine Selektivität oder Spezifität für die Abgangsgruppe und/oder bestimmte Aminosäuren oder Aminosäurebereiche der Carboxykomponente auf. Die Abgangsgruppe und/oder diese Aminosäuren oder Aminosäurebereiche können erfindungsgemäß bevorzugt von dem verwendeten Enzym natürlicherweise erkannte Verbindungen sein. Es kann sich erfindungsgemäß bevorzugt hierbei aber auch jeweils um strukturell ähnliche Verbindungen handeln (Substratmimetika).

Die Begriffe Aminokomponente und Carboxykomponente, wie sie hierin verwendet werden, werden relativ zu dem zu synthetisierenden Polypeptid definiert. Dabei bezeichnet der Begriff der Aminokomponente eine chemische Verbindung, die mindestens eine Aminogruppe zur Verfügung stellt, die mit einer Carboxygruppe oder einem Derivat davon, bspw. einer Carboxygruppe, die mit einer Abgangsgruppe derivatisiert ist, unter Ausbildung einer Peptidbindung reagiert. Bei der Aminokomponente handelt es sich bevorzugt um eine Aminosäure, bevorzugter um ein Polypeptid oder Protein. Im letzteren Falle weist das Polypeptid oder Protein sowohl ein Amino-Ende als auch ein Carboxy-Ende auf. Das Carboxy-Ende liegt dabei entweder ungeschützt oder geschützt vor. Zur Vermeidung einer Reaktion mit einer anderen reaktiven Gruppe, wie beispielsweise der Aminogruppe eines weiteren Moleküls der Aminokomponente, liegt die Carboxylgruppe der Aminokomponente typischerweise und bevorzugt in nicht-aktivierter Form vor. Es ist weiterhin bevorzugt, dass die N^{α} -Aminofunktion der Aminokomponente ungeschützt vorliegt, wobei diese N^{α} -Aminofunktion mit der Carboxyfunktion der Carboxykomponente reagiert.

Bei der Carboxykomponente handelt es sich bevorzugt um eine mit einer Carboxylfunktion versehenen Marker- oder Reportergruppe oder um eine Aminosäure oder, bevorzugter um ein Polypeptid oder Protein. Dabei ist die Carboxylfunktion oder -gruppe der Carboxykomponente, die mit der Aminogruppe, in der Regel der N-terminalen Aminogruppe, der Aminokomponente unter Ausbildung einer Peptidbindung reagiert, typischerweise und bevorzugt aktiviert.

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Abgangsgruppe der Carboxykomponente ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend unsubstituierte und substituierte -O-Alkyl-, -O-Aryl-, -S-Alkyl-, -S-Aryl-Reste, -NH-Alkyl-, -NH-Aryl-, -N,N-Dialkyl-, -N,N-Diaryl- und -N-Aryl-N-Alkyl-Reste, wobei ebenfalls bevorzugt die Abgangsgruppe der Carboxykomponente durch ein oder mehrere Carbonsäurereste, Sulfonsäurereste oder Sulfonate substituiert ist. Der Begriff Alkyl umfasst in dieser Aufzählung auch Cycloalkyl und Heterocycloalkyl. Als Heteroatome kommen insbesondere N, O und S in Frage. Bevorzugt sind Cycloalkane oder Heterocycloalkane mit 5-6 Ring-Kohlenstoffatomen. Unter den Alkylresten sind n-Alkylreste und verzweigte Alkylreste erfindungsgemäß umfasst, bevorzugt sind hierunter n-Alkylreste mit 1 – 5 C-Atomen.

Der Begriff Aryl umfasst in dieser Aufzählung insbesondere substituiertes und unsubstituiertes Phenyl, das bevorzugt durch Guanidino und/oder Amidino am Phenylring substituiert ist. Der Begriff Aryl umfasst hier aber auch anellierte Ringsysteme, bevorzugt Biphenyl, und nicht a-

nelierte Ringsystem wie Naphthyl, die wiederum bevorzugt durch Guanidino- und/oder Amidino-Gruppen substituiert sein können, und heteroanaloge Systeme wie Chinolin oder Isocholin. Der Begriff Aryl umfasst hier auch heteroaromatische Verbindungen mit 5 – 6 Ringatomen, wobei ein oder mehrere Ringkohlenstoffatome bevorzugt durch N, O und/oder S ersetzt sind. Beispiele sind Pyridino-, Thiophen- Furan-, Pyrazol- oder Imidazolreste.

Besonders bevorzugt ist die Abgangsgruppe der Carboxykomponente ein 4-Guanidinophenyl-, 4-Amidinophenyl-, 4-Guanidinophenylthio- oder 4-Amidinophenylthio-Rest oder eine hierzu strukturhomologe Verbindung.

Bei der Carboxykomponente bildet die Abgangsgruppe mit der Carboxygruppe der Carboxykomponente bevorzugt einen Ester oder ein Amid, bevorzugterweise an der C-terminalen Carboxylgruppe der Carboxykomponente. Wie bereits ausgeführt, wird durch die spezifische Erkennung der Abgangsgruppe letztendlich die enzymatische Aktivität des Enzyms dergestalt abgeändert, dass auch Peptidfragmente oder Marker- und Reportergruppen anstelle von Edukten mit enzymspezifischen Aminosäureresten durch die Protease, Hydrolase oder Peptidase verknüpft werden.

Für Arginin-spezifische Proteasen, wie z.B. Trypsin, wurde für die 4-Guanidinophenylester-Abgangsgruppe eine derartige spezifitätsvermittelnde Wirkung festgestellt. Eine analoge Funktion ist auch für Amidinophenylester zu beobachten. Darüber hinaus besitzen aufgrund der Strukturhomologie die 4-Guanidinophenylthioester- und 4-Amidinophenylthioester-Analoga eine ähnliche Wirkung und weisen zudem Vorteile bei der chemischen Synthese auf. Strukturhomologe dieser Verbindungen kommen ebenfalls als spezifitätsvermittelnde Abgangsgruppen in Betracht.

Als strukturhomologe Verbindungen gelten Derivate dieser Verbindungen mit einer basischen Gruppierung, wie beispielsweise Amino-, Amidino-, Guanidino- und Iminogruppierungen, die mit spezifitätsbestimmenden Aminosäureresten der Protease wechselwirken, d.h. insbesondere solchen Aminosäureresten, die direkt oder indirekt mit dem Substrat in Wechselwirkung treten bzw. solchen, die die katalytische Reaktion beeinflussen, und die einen aliphatischen oder aromatischen Grundkörper aufweisen mit z. B. einer Kettenlänge zwischen einer und sechs Methyleneinheiten oder Benzol-, Naphthalin- oder Indol-Grundkörpern zwischen der spezifischen basischen Gruppierung und der Ester- bzw. Amidfunktion als verknüpfendes Element zwischen der Carboxylgruppe der Carboxykomponente und der Abgangsgruppe. Im übertragenen Sinne

gilt dies ebenfalls für Enzyme mit einer primären Spezifität für Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure, wie z.B. die V8 Protease, mit dem Unterschied, dass statt der basischen Gruppierungen an den aliphatischen oder aromatischen Grundkörpern saure Gruppierung wie Carboxyl- und Sulfonsäuregruppen gebunden sind. In analoger Weise stellen Ester oder Amide, die lediglich aus den genannten Grundkörpern bestehen, also keine basischen oder sauren Gruppen aufweisen, Carboxylkomponenten für Enzyme mit einer bevorzugten Spezifität für hydrophobe Aminosäurereste, wie z.B. Chymotrypsin und Subtilisin, dar.

Bevorzugt wird erfindungsgemäß die Abgangsgruppe an die Spezifität der verwendeten Protease, Peptidase und/oder Hydrolase angepasst.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist die die Abgangsgruppe enthaltende Carboxykomponente die folgende Struktur auf:



wobei Y = eine N-terminale Schutzgruppe oder H ist,

Xaa = eine beliebige α -Aminosäure, β -Aminosäure oder ein Derivat derselben oder eine Marker- oder Reportergruppe ist,

R eine Abgangsgruppe ist, insbesondere eine Abgangsgruppe ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend unsubstituierte und substituierte -O-Alkyl-, -O-Aryl-, -S-Alkyl-, -S-Aryl-Reste, bevorzugt 4-Guanidinophenyl-, 4-Amidinophenyl-, 4-Guanidinophenylthio-, 4-Amidinophenylthio-Reste, die jeweils durch Sulfonsäuregruppen oder Sulfonate substituiert sein können, sowie Strukturhomologe hiervon,

n eine ganze Zahl von 1 bis 1000, bevorzugt 30 bis 500, noch bevorzugter 30 bis 250 ist.

Hierbei sind die Begriffe Alkyl und Aryl wie oben definiert und umfassen wie oben auch Cycloalkane, Heterocycloalkane, anellierte Ringsystem und nicht anellierte Ringsysteme sowie die oben erwähnten bevorzugten Ausführungsformen.

Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die Carboxykomponente eine Marker- oder Reportergruppe ist, ausgewählt aus Carboxygruppen enthaltenden Fluoreszenzmarkern wie Fluorescein, Rhodamin, Tetramethylrhodamin, 2-Aminobenzoessäure; Carboxygruppen enthaltenden Isotopenlabeln wie ^{13}C -, ^{15}N - und ^{17}O -enthaltenden Aminosäuren oder Peptidfragmenten; Spinlabeln, wie Nitroxidlabel enthaltende Aminosäure und Fettsäurederivate; Biotin; Carboxygruppen enthaltenden vernetzenden Mittel (cross-linking agents) wie Diazoacetat, Diazopyruvat, p-Nitrophenyl-3-diazopyruvat; 2-(1,2-Dithiolan-3-yl)acetat; N,N'-1,2-Phenylendimaleimid; N,N'-1,4-Phenylendimaleimid. Alle genannten Derivate besitzen eine Carboxygruppe, die vor der enzymatischen Reaktion mit einer der zuvor definierten Abgangsgruppen versehen sind. Insofern handelt es sich bei den genannten Fluoreszenzmarkern nicht um die kompletten Carboxykomponenten, sondern nur um den Teil, der auf die Aminokomponente übertragen wird.

Durch die Verknüpfung der Aminokomponente und der Carboxykomponente wird ein Polypeptid oder selektiv modifiziertes Polypeptid oder Analogon desselben gebildet, wobei das C-terminale Ende der Aminokomponente dem C-terminalen Ende des Polypeptids entspricht und das Amino-terminale Ende der Carboxykomponente dem Amino-Ende des unter dem Einfluss des Enzyms ligierten Polypeptids bzw. der eingeführten Marker- und Reportergruppe entspricht. Die Länge des synthetisierten bzw. modifizierten Polypeptids beträgt mindestens zwei Aminosäuren. Typischerweise wird die Länge des erfindungsgemäß hergestellten Polypeptids oder Proteins eine Größe von 1 bis 1000 Aminosäuren, bevorzugter 30 bis 1000, noch bevorzugter 50 bis 600 und am bevorzugtesten 100 bis 300 Aminosäuren aufweisen.

Die Größe der Aminokomponente kann sowenig wie eine Aminosäure betragen. Eine obere Grenze der Länge der Aminokomponente ist nicht notwendigerweise gegeben, wird jedoch letzten Endes, wenn überhaupt, durch die Spezifität des verwendeten Enzyms sowie reaktionskinetischen Betrachtungen, wie beispielsweise Diffusionsgeschwindigkeit der Aminokomponente, bestimmt werden. Typische Größen der Aminokomponente sind dabei 1 bis 1000 Aminosäuren, bevorzugter 30 bis 500 Aminosäuren und bevorzugter 30 bis 250 Aminosäuren. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Länge der Aminokomponente deutlich größer ist, insbesondere bei solchen Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei denen eine sequenzielle Enzym- bzw. Protease-katalysierte Peptidfragmentligation erfolgt oder ein Protein als Edukt dient. Die Länge beträgt dann bevorzugter Weise ein Vielfaches der vorstehend genannten Längenbereiche. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Aminokomponente größer, gleich oder kleiner als die Carboxykomponente

ausgebildet ist, wobei als Kriterium hierzu in der Regel die Anzahl der die Aminokomponente bzw. die Carboxykomponente ausbildenden Aminosäuren herangezogen wird.

Es ist bevorzugt, dass die Carboxykomponente eine Größe von 1 bis 1000 Aminosäuren, bevorzugt 30 bis 500, noch bevorzugter 30 bis 250 Aminosäuren aufweist.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist bevorzugter Weise vorgesehen, dass als Aminokomponente N-terminal ungeschützte Peptide, Peptidmimetika und Proteine eingesetzt werden.

Die Reaktion erfolgt bevorzugt in reinen ionischen Flüssigkeiten, wie z.B. 4-Methyl-*N*-butylpyridinium-tetrafluorborat, mit keinem oder nur sehr geringem Wassergehalt (typischer Weise kleiner als 5%).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung beträgt der Anteil der ionischen Flüssigkeiten im Reaktionsmedium 50 – 100 Vol.-%, bevorzugt 70 – 100 oder 80 – 100 Vol.-%, bevorzugter 90- 100 Vol.-%, ebenfalls bevorzugt 95 bis 100 Vol.-%, 95 – 99 Vol.-% oder 97-99 Vol.-%.

Gemische aus ionischen Flüssigkeiten und organischen Lösungsmitteln mit und ohne Wasseranteil und weiteren Zusätzen, wie z.B. anorganischen Salzen, stellen ebenfalls Reaktionsmedien im Sinne der Erfindung dar, wobei es unerheblich ist, ob es sich um eine Lösung oder Suspension handelt. Als Zusätze können insbesondere eingesetzt werden: anorganische Salze, Pufferkomponenten, Reduktions- und Oxidationsmittel, Enzymaktivatoren, –modulatoren und –inhibitoren, Tenside, Lipide, Polymere zur kovalenten bzw. adhesiven Immobilisierung von Proteinen (z.B. Polyethylenglycol, Methoxypolyethylenglycol oder Carboxymethylcellulose) und proteindenaturierende Agenzien wie SDS (Sodiumdodecylsulfat), Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid.

Ein entscheidender Vorteil der Verwendung von Lösungsmittelgemischen kann in der Erhöhung oder Verringerung der Löslichkeit von Edukten oder Enzym bzw. in der Beeinflussbarkeit der Enzymaktivität und –spezifität durch Anzahl, Art und Anteil der zusätzlich zur ionischen Flüssigkeit verwendeten Lösungsmittel liegen.

Erfindungsgemäß sind bevorzugt mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel einsetzbar, wenn diese sich auch mit den ionischen Flüssigkeiten mischen. Andererseits sind erfindungsgemäß auch hydrophobe organische Lösungsmittel (z.B. Hexan oder Oktan) umfasst, die nicht mit

Wasser mischbar sind, wobei das Lösungsmittelgemisch als biphasiges System vorliegt. Erfindungsgemäß ist auch die Verwendung von modifizierten ionischen Flüssigkeiten mit hydrophoben Alkylgruppen die sich entweder teilweise oder vollständig mit hydrophoben organischen Lösungsmitteln mischen, umfasst.

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass ionische Flüssigkeiten eingesetzt werden, bei denen die Kationen Alkyl-Imidazolium-Ionen, Alkyl-Ammonium-Ionen, Alkyl-Pyridinium-Ionen und/oder Alkyl-Phosphonium-Ionen sind, wobei die Alkylierung jeweils vollständig ist, d.h. keines der genannten Heteroatome an ein Wasserstoff gebunden ist, die also quaternisiert sind.

Ebenfalls bevorzugt ist, dass die Alkylreste der ionischen Flüssigkeiten verzweigt oder unverzweigt sind und 1-20 C-Atome, bevorzugt 1-20 C-Atome, noch bevorzugter 4-6 C-Atome aufweisen. Besonders bevorzugt ist, wenn mindestens ein Alkylrest Methyl, Ethyl Propyl oder Butyl ist, insbesondere Butyl.

Als Anionen der ionischen Flüssigkeiten sind erfindungsgemäß Chlorid, Bromid, Chloraluminat, Nitrat, Benzolsulfonat, Triflat (Trifluormethansulfonat), Tosylat und/oder Tetrafluorborat bevorzugt einsetzbar.

Es ist erfindungsgemäß besonders bevorzugt, dass als ionische Flüssigkeiten 1-Ethyl-3-methylimidazolium-, 1-Butyl-3-methylimidazolium- und/oder 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-Salze eingesetzt werden, wobei das jeweilige Tetrafluorborat besonders bevorzugt ist.

Die Synthese der Carboxykomponenten mit der bevorzugter Weise Enzym-spezifischen Abgangsgruppe kann chemisch durch Kondensation des Acylrestes der Carboxykomponente mit der jeweiligen Abgangsgruppe (oder geeigneten Vorstufen) oder aber am polymeren Träger, z.B. durch Verwendung von Sulfamylbutyrylaminomethyl-Safety-Catch-Harzen (vgl. R. Ingnito et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11369) oder Oxim-Harzen (vgl. V. Cerovsky, F. Bordusa, *J. Peptide Res.* **2000**, 55, 325; V. Cerovsky et al., *ChemBioChem* **2000**, 2, 126) mit synchroner Ester- bzw. Amid-Generierung und Peptidabspaltung erfolgen. Als ablösendes Nukleophil kommt die entsprechende alkoholische, phenolische, Mercapto- oder Aminogruppen enthaltende Abgangsgruppe selbst, wie auch bereits vorgefertigte N^α -ungeschützte Aminosäure-ester bzw. -amide oder geeignete Vorstufen zum Einsatz. Alternativ kann die Synthese der Carboxykomponente auf gentechnischem Wege wie z.B. durch Verwendung der Intein-vermittelten Polypeptidestersynthese erfolgen (M. W. Southworth et al., *Biotechniques* **1999**, 27, 110). Die

Anpassung der Abgangsgruppe kann durch die Wahl des Nukleophiles bei der Inteinspaltung oder aber nach bereits erfolgter Estergenerierung durch Umesterung in Lösung erfolgen.

Die Synthese der als Aminokomponenten eingesetzten Peptidfragmente ist in Lösung oder durch Verwendung konventioneller Fmoc- oder Boc-Syntheseprotokolle am polymeren Träger routinemäßig möglich. Üblicherweise ist die Synthese am polymeren Träger wegen der Vorteile bei der Aufreinigung der einzelnen Zwischenprodukte einer aufwendigeren Lösungssynthese vorzuziehen. Alternativ kann die Aminokomponente aus biologischem Material gewonnen oder durch gentechnische Verfahren mit anschließender Isolierung exprimiert werden.

Die erhaltenen synthetisierten oder markierten Produkte können mit üblichen Methoden der Peptid- und Proteinchemie separiert und gereinigt werden. Ggf. vorhandene Schutzgruppen können nach im Stand der Technik bekannten Verfahren entfernt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann eine gemäß den Schritten a) bis c) und ggf. d) hergestellte Verbindung als Aminokomponente und eine andere gemäß den Schritten a) bis c) und ggf. d) hergestellte Verbindung als Carboxykomponente eingesetzt werden, um größere Polypeptide oder Proteine aus definierten Bestandteilen aufzubauen, die je nach Verfahrensführung auch Marker- oder Reportergruppen aufweisen können.

Im Gegensatz zu anderen potentiell verwendbaren biokatalytischen Verfahren wird durch die erfindungsgemäße Verwendung von ionischen Flüssigkeiten oder Mischungen derselben in Kombination mit dem Einsatz von Enzymen und insbesondere Proteasen und Peptidasen eine hohe Syntheserate, Flexibilität, Syntheseeffizienz und Einfachheit in der Handhabung erreicht.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der Zeichnungen und Beispiele veranschaulicht, aus denen sich weitere Merkmale, Ausführungsformen und Vorteile der Erfindung ergeben.

Dabei zeigt Fig. 1 ein ausgesuchtes MALDI-ToF Massenspektrum des unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens und wie in Beispiel 4 beschrieben hergestellten biotinylierten Peptids.

Beispiele

Beispiel 1 – Einfluss des Anteiles der ionischen Flüssigkeit 4-Methyl-*N*-butyl-pyridinium tetrafluorborat auf die Trypsin-katalysierte Synthese von Di- und Tripeptiden (Bz, Benzoyl; OGp, 4-Guanidinophenylester).

1 ml Reaktionslösung, die die in Tab. 1 angegebenen Gemische aus 4-Methyl-*N*-butyl-pyridinium tetrafluorborat enthält sowie 0,1 M Hepes-Puffer pH 8,0, enthaltend 0,1 M NaCl und 0,01 M CaCl₂, 1,5% (v/v) 4-Methylmorpholin, 2 mM Bz-Phe-OGp, 20 mM Aminokomponente und 10 µM Trypsin enthält, wird bei 25 °C gerührt. Nach 30-120 min wird die Reaktionslösung mit 1 proz. Trifluoressigsäure in Methanol/Wasser (1:1, v/v) auf pH 2 gebracht. Die Ausbeuten an Di- und Tripeptid wurden HPLC-analytisch bestimmt und sind in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführt.

Die Synthese von Bz-Phe-OGp erfolgte analog des Syntheseprotokolles von M. Thormann et al., *Biochemistry* 1999, 38, 6056. Die verwendeten Aminokomponenten sind kommerziell erhältliche Produkte und sind in Tab 1 angegeben. Trypsin wurde von Fluka (Schweiz) bezogen.

Tabelle 1:

Anteil an ionischer Flüssigkeit (v/v)	H-Leu-NH ₂	H-Gly-NH ₂	H-Met-NH ₂	H-Ser-NH ₂	H-Ala-Met-OH
0	75,2	45,2	68,0	52,1	51,5
20	77,4	49,1	69,3	54,5	53,9
40	79,7	54,1	72,9	58,4	57,6
60	85,8	62,4	77,0	68,9	68,5
80	87,3	64,7	79,0	70,4	71,4

Beispiel 2 – Einfluss der Art und des Anteiles zusätzlicher organischer Lösungsmittel auf die Trypsin-katalysierte Synthese von Bz-Phe-Leu-NH₂ ausgehend von Bz-Phe-OGp und H-Leu-NH₂ in der ionischen Flüssigkeit 4-Methyl-*N*-butyl-pyridinium tetrafluorborat (Bz, Benzoyl; OGp, 4-Guanidinophenylester; MeOH, Methanol; DMSO, Dimethylsulfoxid; DMF, Dimethylformamid).

1 ml Reaktionslösung, die 4-Methyl-*N*-butyl-pyridinium tetrafluorborat, 5% Wasser und die angegebenen Anteile an zusätzlichem organischen Lösungsmittel, 1,5% (v/v) 4-

Methylmorpholin, 2 mM Bz-Phe-OGp, 20 mM Aminokomponente und 20, 40, 80, 200 μ M Trypsin (mit steigendem Anteil an zusätzlichem organischen Lösungsmittel) enthält, wird bei 25 °C gerührt. Nach 30-120 min wird die Reaktionslösung mit 1 proz. Trifluoressigsäure in Methanol/Wasser (1:1, v/v) auf pH 2 gebracht. Die Ausbeuten wurden HPLC-analytisch bestimmt und sind in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2:

Organisches Lösungsmittel	Produktausbeute (%) / Verhältnis ionische Flüssigkeit : organisches Lösungsmittel			
	50 : 50 (v/v)	60 : 40 (v/v)	70 : 30 (v/v)	80 : 20 (v/v)
MeOH	93.2	93.7	93.8	94.7
DMSO	91.9	92.4	92.8	94.8
DMF	91.7	92.0	92.7	93.7

Beispiel 3 – Trypsin-katalysierte Synthese von Polypeptiden mit enzym-spezifischen Spaltstellen ausgehend von Bz-Phe-OGp und Polypeptiden verschiedener Länge und Sequenz in der ionischen Flüssigkeit 4-Methyl-*N*-butyl-pyridinium tetrafluorborat.

Die individuellen enzym-spezifischen Aminosäurereste sind jeweils durch Fettdruck hervorgehoben (Bz, Benzoyl; OGp, 4-Guanidinophenylester).

1 ml Reaktionslösung, die 4-Methyl-*N*-butyl-pyridinium tetrafluorborat, 5% Wasser, 1,5% (v/v) 4-Methylmorpholin, 2 mM Bz-Phe-OGp, 5 mM Aminokomponente und 10 μ M Trypsin enthält, wird bei 25 °C gerührt. Aus Löslichkeitsgründen wurden die Reaktionen mit Methanol als zusätzliches organisches Lösungsmittel durchgeführt, wobei sowohl ein Anteil von 20% als auch 50% (v/v) Methanol verwendet wurde. Nach 30-120 min wird die Reaktionslösung mit 1 proz. Trifluoressigsäure in Methanol/Wasser (1:1, v/v) auf pH 2 gebracht. Die mittels MALDI-ToF nach ihrer Isolierung aus der Reaktionslösung identifizierten Polypeptidprodukte sind mit den jeweils berechneten bzw. gefundenen Molekülmassen in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3:

Syntheseprodukt	berechnete Masse [g/mol]*	Gefundene Masse [g/mol]
Bz-FAARAG	695,34	696,3 (+H ⁺)

Bz-FRIVDARLEQVKAAGAY	2010,07	2025,09 (+Na ⁺)
Bz-FRIVDAVLEQVKAAGAY	1953,04	1954,31 (+H ⁺)
Bz-FKVVFSAPV LEPTGPLHTQ FGYHIIKVLY RN	3673,98	3690,50 (+Na ⁺)

* Angabe der monoisotopischen Massen

Beispiel 4 – Trypsin-katalysierte N-terminale Einführung der Markergruppe Biotin in Polypeptiden mit enzym-spezifischen Spaltstellen ausgehend von Biotinyl-OGp und Polypeptiden verschiedener Länge und Sequenz in der ionischen Flüssigkeit 4-Methyl-*N*-butyl-pyridinium tetrafluorborat.

Die individuellen enzym-spezifischen Aminosäurereste sind jeweils durch Fettdruck hervorgehoben (Bz, Benzoyl; OGp, 4-Guanidinophenylester).

Die Reaktionsbedingungen entsprechen denjenigen von Beispiel 3. Geändert wurden lediglich die Konzentrationen von Carboxykomponente (Biotinyl-OGp: 4 mM) und Aminokomponente (jeweiliges Peptid: 2 mM). Die mittels MALDI-ToF nach ihrer Isolierung aus der Reaktionslösung identifizierten Polypeptidprodukte sind mit den jeweils berechneten bzw. gefundenen Molekülmassen in Tabelle 4 aufgeführt. Die Selektivität der enzymatischen Biotinylierungsreaktionen wurde durch Verwendung von N-terminal acetylierten Peptidanaloga untersucht. Das Ausbleiben einer Produktbildung in diesen Fällen wurde als Bestätigung einer ausschließlichen N-terminalen Biotinylierung gewertet.

Tabelle 4:

Syntheseprodukt	berechnete Masse [g/mol]*	Gefundene Masse [g/mol]
Biotinyl-RIVDARLEQVKAAGAY	1985,05	1986,31 (+H ⁺)
Biotinyl-KVVFSAPV LEPTGPLHTQ FGYHIIKVLY RN	3648,96	3649,67 (+H ⁺)

* Angabe der monoisotopischen Massen

Das erhaltene MALDI-ToF Massenspektrum des Syntheseproduktes Biotinyl-RIVDARLEQVKAAGAY ist beispielhaft in Fig. 1 dargestellt. Die gefundene Molmasse von 1986,31 entspricht dem (M+H⁺) Signal der mit 1985,05 berechneten monoisotopischen Molmasse des Peptidproduktes.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in verschiedenen Ausführungsformen eingesetzt werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Synthese von Peptiden, Peptidmimetika und/oder Proteinen und/oder zur selektiven N-terminalen Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und/oder Proteinen, mit den Schritten:

- a) Bereitstellen einer Aminokomponente, wobei die Aminokomponente mindestens eine Aminosäure aufweist,
- b) Bereitstellen einer Carboxykomponente, wobei die Carboxykomponente eine Abgangsgruppe an der Carboxylgruppe aufweist, und die Carboxykomponente eine Verbindung mit mindestens einer Aminosäure ist oder eine Verbindung mit mindestens einer Marker- oder Reportergruppe,
- c) Umsetzen der Aminokomponente und der Carboxykomponente in einem Reaktionsmedium, welches ein oder mehrere ionische Flüssigkeiten aufweist, in Gegenwart einer Protease, Peptidase und/oder Hydrolase, wobei zwischen der Aminokomponente und der Carboxykomponente unter Abspaltung der Abgangsgruppe eine Peptidbindung gebildet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend als Schritt:

- d) Anreichern und/oder Isolieren des erhaltenen Peptids, Peptidmimetikums und/oder Proteins nach an sich bekannten Verfahren.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminokomponente ein Polypeptid oder Protein ist.

4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminokomponente eine Größe von 1 bis 1000 Aminosäuren, bevorzugt 30 bis 500, noch bevorzugter 30 bis 250 Aminosäuren aufweist.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,
dass das Carboxy-Ende der Aminokomponente geschützt oder ungeschützt in nicht aktivierter Form vorliegt.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die N^α -Aminofunktion der Aminokomponente ungeschützt vorliegt, wobei diese N^α -Aminofunktion mit der Carboxyfunktion der Carboxykomponente reagiert.

7. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Carboxykomponente ein Polypeptid oder Protein ist.

8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Carboxykomponente eine Größe von 1 bis 1000 Aminosäuren, bevorzugt 30 bis 500, noch bevorzugter 30 bis 250 Aminosäuren aufweist.

9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Carboxy-Gruppe der Carboxykomponente mit der Abgangsgruppe einen Carbonsäureester oder ein Carbonsäureamid bildet.

10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Abgangsgruppe der Carboxykomponente ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend unsubstituierte und substituierte -O-Alkyl-, -O-Aryl-, -S-Alkyl-, -S-Aryl-Reste, -NH-Alkyl-, -NH-Aryl-, -N,N-Dialkyl-, -N,N-Diaryl- und -N-Aryl-N-Alkyl-Reste.

11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Abgangsgruppe der Carboxykomponente durch ein oder mehrere Carbonsäurereste, Sulfonsäurereste oder Sulfonate substituiert ist.

12. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Abgangsgruppe ein 4-Guanidinophenyl-, 4-Amidinophenyl-, 4-Guanidinophenylthio- oder 4-Amidinophenylthio-Rest ist oder eine hierzu strukturhomologe Verbindung.

13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Abgangsgruppe an die Spezifität der verwendeten Protease, Peptidase und/oder Hydrolase angepasst wird.

14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass

die die Abgangsgruppe enthaltende Carboxykomponente die folgende Struktur aufweist:



wobei Y = eine N-terminale Schutzgruppe oder H ist,

Xaa = eine beliebige α -Aminosäure, β -Aminosäure oder ein Derivat derselben oder eine Marker- oder Reportergruppe ist,

R eine Abgangsgruppe ist, insbesondere eine Abgangsgruppe ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend unsubstituierte und substituierte -O-Alkyl-, -O-Aryl-, -S-Alkyl-, -S-Aryl-Reste, bevorzugt 4-Guanidinophenyl-, 4-Amidinophenyl-, 4-Guanidinophenylthio-, 4-Amidinophenylthio-Reste, die jeweils durch Sulfonsäuregruppen oder Sulfonate substituiert sein können, sowie Strukturhomologe hiervon,

n eine ganze Zahl von 1 bis 1000, bevorzugt 30 bis 500, noch bevorzugter 30 bis 250 ist.

15. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Carboxykomponente eine Marker- oder Reportergruppe ist, ausgewählt aus Carboxygruppen enthaltenden Fluoreszenzmarkern wie Fluorescein, Rhodamin, Tetramethylrhodamin, 2-Aminobenzoessäure; Carboxygruppen enthaltenden Isotopenlabeln wie ^{13}C -, ^{15}N - und ^{17}O -enthaltenden Aminosäuren oder Peptidfragmenten; Carboxygruppen enthaltenden Spinla-

beln, wie Nitroxidlabel enthaltende Aminosäure und Fettsäurederivate; Biotin; Carboxygruppen enthaltenden vernetzenden Mittel (cross-linking agents) wie Diazoacetat, Diazopyruvat, p-Nitrophenyl-3-diazopyruvat, 2-(1,2-Dithiolan-3-yl)acetat; N,N'-1,2-Phenylendimaleimid; N,N'-1,4-Phenylendimaleimid.

16. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte a) bis c) und wahlweise d) zwei- oder mehrfach durchgeführt werden, um sequenziell ein Polypeptid oder Protein, das eine Marker- oder Reportergruppe aufweisen kann, herzustellen.

17. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine gemäß den Schritten a) bis c) und ggf. d) hergestellte Verbindung als Aminokomponente und eine andere gemäß den Schritten a) bis c) und ggf. d) hergestellte Verbindung als Carboxykomponente eingesetzt wird.

18. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium ausschließlich ein oder mehrere ionische Flüssigkeiten aufweist.

19. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium ein oder mehrere ionische Flüssigkeiten und weiterhin Wasser und/oder ein organisches Lösungsmittel und wahlweise übliche Zusätze umfasst.

20. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil der ionischen Flüssigkeiten im Reaktionsmedium 50 – 100 Vol.-%, bevorzugt 70 – 100 oder 80 – 100 Vol.-%, bevorzugter 90 - 100 Vol.-%, ebenfalls bevorzugt 95 bis 100 Vol.-% oder 95 – 99 Vol.-% beträgt.

21. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass

als Kationen der ionischen Flüssigkeiten quaternisierte Alkyl-Imidazolium-Ionen, quaternisierte Alkyl-Ammonium-Ionen, quaternisierte Alkyl-Pyridinium-Ionen und/oder quaternisierte Alkyl-Phosphonium-Ionen eingesetzt werden.

22. Verfahren nach Anspruch 21,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Alkylreste der ionischen Flüssigkeiten verzweigt oder unverzweigt sind und 1 - 20 C-Atome, bevorzugt 2 - 10 C-Atome, noch bevorzugter 4 - 6 C-Atome aufweisen.

23. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass

als ionische Flüssigkeiten 1-Ethyl-3-methylimidazolium-, 1-Butyl-3-methylimidazolium- und/oder 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-Salze eingesetzt werden.

24. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass

als Anionen der ionischen Flüssigkeiten Chlorid, Bromid, Chloraluminat, Nitrat, Benzolsulfonat, Triflat (Trifluormethansulfonat), Tosylat und/oder Tetrafluorborat eingesetzt werden.

25. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

dass als Protease eine Cysteinprotease oder Serinprotease verwendet wird.

26. Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als ausschließliches Lösungsmittel oder in Kombination mit Wasser und/oder organischen Lösungsmitteln zur Synthese und/oder N-

terminalen Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und/oder Proteinen.

27. Verwendung einer Protease, Peptidase und/oder Hydrolase zur Synthese und/oder N-

terminalen Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und Proteinen, wobei das Peptid, Peptidmimetikum und Protein oder deren N-terminal markierte Spezies durch Ligation einer Aminosäurekomponente und einer Carboxykomponente hergestellt wird und die Carboxykomponente eine Abgangsgruppe aufweist.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Peptiden, Peptidmimetika und/oder Proteinen und/oder zur selektiven N-terminalen Modifizierung von Peptiden, Peptidmimetika und/oder Proteinen,

mit den Schritten:

- a) Bereitstellen einer Aminokomponente, wobei die Aminokomponente mindestens eine Aminosäure aufweist,
- b) Bereitstellen einer Carboxykomponente, wobei die Carboxykomponente eine Abgangsgruppe an der Carboxylgruppe aufweist, und die Carboxykomponente eine Verbindung mit mindestens einer Aminosäure ist oder eine Verbindung mit mindestens einer Marker- oder Reportergruppe,
- c) Umsetzen der Aminokomponente und der Carboxykomponente in einem Reaktionsmedium, welches ein oder mehrere ionische Flüssigkeiten aufweist, in Gegenwart einer Protease, Peptidase und/oder Hydrolase, wobei zwischen der Aminokomponente und der Carboxykomponente unter Abspaltung der Abgangsgruppe eine Peptidbindung gebildet wird.

Figur 1